小地老虎及粘虫幼虫对灭幼脲表现自然耐药力的体壁结构和生化基础*

龚国玑　王荫长　尤子平
(南京农业大学植保系)

摘要　小地老虎 *Agrotis ypsilon* rottem. 幼虫对灭幼脲具有一定的自然耐药力。本文以粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 作为敏感性虫种与之进行比较，实验结果表明，灭幼脲对两种试虫的室内毒力相差 4 倍左右，引起差异的原因，在体壁结构方面主要在于：(1) 小地老虎幼虫的表皮层较粘虫的厚 4.2 倍左右；(2) 上表皮不是匀质结构，依靠少数蜡道与体表沟通；(3) 几丁质片层内的孔道数较少，仅及粘虫的 1/4。由此构成了表皮对疏水性的灭幼脲表现抗穿透的性能。小地老虎幼虫体壁还含有较强的生化防卫体系，灭幼脲对多功能氧化酶、芳基酰胺酶有明显激活效应，这两种酶都是灭幼脲的降解酶。由此认为，小地老虎幼虫对灭幼脲所表现的自然耐药力，是由体壁的抗穿透性能以及由灭幼脲所激活的适应酶所造成。

关键词　小地老虎幼虫　粘虫幼虫　灭幼脲　LD_{50} 体壁屏障作用　多功能氧化酶　芳基酰胺酶

灭幼脲(或称灭幼脲 1 号；TH6040) 对一些害虫具有高效和高选择性而被认为是一类有前途的新型杀虫剂 (Verloop 1977, Misato, 1978)。但一些害虫对灭幼脲并不敏感，表现高的自然耐药力，例如云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* (Clemens) 和西方云杉卷叶蛾 *C. occidentalis* (Freeman)，对灭幼脲的药效相差 1,500 倍 (Retuakaran, 1980)。有些害虫也可对灭幼脲产生较高抗药力，如 El-Guindy(1983) 报道，在室内经灭幼脲 30 代抗性选育的棉叶夜蛾 *Spodoptera littoralis* (Boisd.)，不仅抗性增加 290.8 倍，而且引起了广泛的交互抗性。如对杀螟松的交互抗性达 54.6 倍，二氯苯醚菊酯 9.3 倍，杀灭菊酯25.9 倍等。这些情况对灭幼脲的应用和发展提出了必需强调合理使用和抗性机制的研究。张宗炳(1980)、Cohen 等(1982)、Marks, 等 (1982) 对灭幼脲的研究进展及毒杀机制都作过很好的述评，但毒杀机理和抗药性之间的关系则尚未见报道。为此，本文试图以对灭幼脲敏感的粘虫作为对照虫种，着重分析小地老虎幼虫体壁结构的屏障作用以及体壁内多功能氧化酶、芳基酰胺酶与灭幼脲发挥毒效的关系，用以探明小地老虎 (*Agrotis ypsilon* Rottem.) 幼虫对灭幼脲表现较高自然耐力的生理生化基础，为克服抗药性的发展，延长灭幼脲的使用寿命和扩大应用范围，寻找理论依据。

材 料 和 方 法

一、供试昆虫　小地老虎和粘虫 (*Mythimna separata* Walker) 都采自南京早春越冬代成虫，室内饲养繁殖(室温 24—26℃，半人工饲料)，选用大小一致的五龄或六龄幼虫，

本文于 1984 年 10 月收到。

* 本试验所用测试芳基酰胺酶的基质，由本校邢月华、蒋木庚老师协助合成。灭幼脲样品，由江苏省昆虫激素研究所提供，在此一并致谢。

六龄幼虫采用一日龄的,部分为初蜕皮幼虫。

二、供试药剂　灭幼脲系江苏省昆虫激素研究所 1979 年所提供的样品。

三、试验方法

1. 表皮超微结构的观察　取幼虫中胸背板，用戊二醛和锇酸双固定，EPON 812 包埋,醋酸铅和醋酸铀染色,切片厚度为 500 Å，在国产 OXA4-10 型透射电镜下观察并摄影。

2. 毒力测定　用毛细管点滴法和血腔注射法进行。点滴部位为中胸背板，四氢呋喃为溶剂点滴 3 微升。处理后 48 小时计算 LD_{50} 值。处理后至化蛹期间的累计 50% 和 100% 死亡剂量作为效应剂量（ED_{50} 和 ED_{100}）。

3. 几丁醣含量测定　经 LD_{50} 灭幼脲剂量处理的活小地老虎幼虫,以常规秤重法测定几丁醣含量(二龄 1 日龄,平均为蜕后 8 小时以内，每头注射药液 1 微升。逐日测定活个体的几丁含量)。

4. 酶活力测定　以 LD_{50} 或 1/2 LD_{50} 灭幼脲处理后 48 小时的活试虫体壁，由 Tris-HCl 缓冲液配制成含有 1 头或 2 头的酶浓度,于 10,000 转/分的匀浆机速度匀浆，4,000 转/分离心 10 分钟,取上消液备用。制备酶液在 0℃ 下进行,酶制备液贮于-4℃下使用期不超过 2 天。

(1) 多功能氧化酶（MFO）活力测定　根据 Hansen 等(1971)的方法进行,以对硝基苯甲醚（PNA）为基质，在还原型辅酶 II 的作用下，置 28℃ 反应 30 分钟,加入定量 $CHCl_3$ 提取酶促反应的产物对硝基苯酚，经分层、离心、置 400nm 下测定光密度值。

(2) 芳基酰胺酶活力测定　根据 Glesson 等(1976)的方法进行. 以对硝基苯乙酰胺为基质,在 Ca^{++} 的催化下,于 28℃ 反应 30 分钟，由芳基酰胺酶催化底物脱乙酰基生成的对硝基苯胺,在 410nm 下有最大的吸收峰。

结 果 与 分 析

一、小地老虎幼虫对灭幼脲的耐药力测定

1. 室内毒力测定及中毒症状　两种试虫的致死中量（LD_{50}）及效应剂量（ED_{50} 和 ED_{100}）列于表 1。其结果表明：小地老虎幼虫对灭幼脲的耐药力显著高于粘虫；五龄幼虫较同龄粘虫约高 4.9 倍,六龄幼虫约高 3.9 倍。中毒反应也较慢，如五龄幼虫的触杀 LD_{50} 值较 ED_{50} 高 2.82 倍，即实际上只需急性 LD_{50}（48 小时）的 1/3 左右的剂量即可达到在化蛹前累计 50% 死亡率。而粘虫六龄幼虫的 LD_{50} 值几乎与 ED_{50} 值相等，说明 48 小时的半数致死剂量实际上可在化蛹前 100% 致死，再根据两种试虫的效应剂量(ED) 比较,小地老虎五龄和六龄幼虫的 ED_{50} 值，分别是同龄粘虫 ED_{100} 值的 3.29 和 2.87 倍,进一步表明小地老虎幼虫的耐药力,远大于粘虫幼虫。

用 LD_{50} 剂量的灭幼脲处理两种试虫的六龄初蜕幼虫，小地老虎受药后，无异常表现,24 小时内偶见死亡,但至预蛹期则多数表现体色增深，表皮无弹性，体壁渗水或成畸蛹而死。粘虫的反应较快，24 小时前后即陆续死亡。

2. 灭幼脲对小地老虎幼虫体壁几丁含量的影响　用秤重法测定得知，小地老虎六龄初蜕的表皮内含几丁量占表皮重量的 18—20%，至 3—4 龄增长到 50%，以后不再增长。

表 1　灭幼脲对两种试虫的毒力和相对耐药力

供试虫种	龄期	LD_{50} μg/幼虫	ED_{50} μg/幼虫	ED_{100} μg/幼虫	相对耐药力*		
					龄期间		虫种间
					LD_{50}	ED_{50} 及 ED_{100}	LD_{50}
小地老虎幼虫	5	69.59	24.67	—	1	1	4.87
	6	136.23	103.21	—	1.96	4.18	3.90
粘虫幼虫	5	14.30	—	<7.5	1	1	1
	6	34.94	—	<36	2.44	4.8	1

* 相对耐药力 $=\frac{LD_{50}\text{ 较大值}}{LD_{50}\text{ 较小值}}$ 或 $\frac{ED_{50}\text{ 或 }ED_{100}\text{ 较大值}}{ED_{50}\text{ 或 }ED_{100}\text{ 较小值}}$

但经灭幼脲处理的活幼虫，即使外观无明显症状，几丁含量仅维持在初蜕时的水平，以 LD_{50} 处理的幼虫，由于几丁含量过低，不能和表皮蛋白质形成交联骨架，也不能附着肌纤维，以至在变态期不能忍受体内压力，体壁破裂死亡。用低于 1/2 LD_{50} 剂量处理的试虫，变态不受影响，成虫羽化率可达 80% 左右，说明灭幼脲对几丁合成的抑制，有一个临界阈值，除几丁合成受抑制外，体色增深说明酚氧化酶会随之增长。

3. 低剂量灭幼脲对小地老虎幼虫生长发育的影响　用低于 1/2 LD_{50} 剂量的灭幼脲处理小地老虎 4 龄幼虫，不仅生长量增加，生长期也相应延长（见表 2）。这种生长促进作用对于大田应用灭幼脲防治害虫时，将是一个缺点，因为如果小地老虎幼虫所表现的现象有普遍性的话，很可能有一部分虫体接受到的药量是低剂量的，它不仅不会中毒，反而有延长生长为害的可能，因此，对具有自然耐药性的害虫，使用灭幼脲前要注意这个问题。

表 2　灭幼脲对小地老虎 4 龄幼虫的生长调节作用

处理 / 幼虫体重增长倍数	对照（点滴丙酮）	灭幼脲丙酮液*	
		（8.41μg/头*）	（25.23μg/头）
20 头幼虫总体重（mg）	221	240	212
4 天后总重增长倍数	2.45	3.75	2.58
15 天后总重增长倍数	7.78	13.92	9.46
20 天后总重增长倍数已老熟	30.47	38.42	40.75
增长比值	1	1.26	1.34

* 灭幼脲点滴量低于 1/2 LD_{50} 值

二、小地老虎幼虫体壁对灭幼脲的屏障作用及与粘虫幼虫的比较　电镜观察比较了两种试虫体壁结构的异同，所用材料为六龄 3 日龄幼虫的中胸背板，结果见表 3 及图版 I IV。从表 3 及图版得知，小地老虎幼虫的体壁较同龄粘虫的厚 4 倍以上，几丁质内表皮层

表 3 两种试虫的六龄幼虫体壁结构比较*

体壁组分厚度 \ 虫种	小地老虎幼虫	粘虫幼虫	相差倍数
上表皮 (μ)	0.788	0.415	+19
几丁质内表皮(μ)	31.66	7.35	+4.3
整个表皮层 (μ)	32.45	7.77	+4.18
几丁质内表皮的片层数	50～60	10～12	+5
几丁质层内孔道数(条/μ)	0.82	3.1	−3.78
皮细胞层 (μ)	11.42	6.7	+1.70
底膜 (μ)	0.337	0.143	+2.36

* 表内数字取自电镜照片任意 4 点的平均数

内的片层数为粘虫幼虫的 5 倍，上表皮中仅具有稀疏的蜡道与体表沟通，而粘虫幼虫的上表皮似为匀质结构，未见蜡道。如果匀质的上表皮可允许亲脂的灭幼脲通透的话，则粘虫上表皮被灭幼脲穿透的量，必然远大于仅由蜡道通透的小地老虎幼虫(见图版 I—IV)。此外，小地老虎幼虫的几丁片层内的孔道数仅为粘虫的 1/4，而底膜厚度则是粘虫的 2.4 倍，从这些超微结构的数据可知，小地老虎幼虫体壁对灭幼脲的抗穿透性，应是表现自然耐力的一个重要因素。

为了进一步证实体壁对灭幼脲的屏障能力，又进行了不通过体壁穿透，直接注射进血腔的毒力测定。以注射 LD_{50} 和点滴 LD_{50} 比较，两种试虫体壁对灭幼脲的屏障作用，小地老虎为粘虫的 3.2 倍。

三、两种试虫体壁内两种酶系与耐药力的关系 昆虫体壁内存在的水解酶和氧化酶的活力，如酰胺酶，多功能氧化酶等，可能和灭幼脲的降解代谢直接相关。本试验对两种试虫经灭幼脲处理后，对酶系的影响作了测定和比较，其中多功能氧化酶仅以 0-脱甲基氧化酶为代表。测定结果如下。

1. MFO 活力测定 对两种试虫都作了 MFO 专一性抑制剂氧化胡椒基丁醚(Pb)的增效试验和 MFO 的活力测定。结果发现 Pb 对灭幼脲无增效作用，无论 1:2 或 2:1 的混合比例，增效比都等于 1。两种试虫的 MFO 活性以相当于 1 头幼虫体壁的酶浓度反应液中，未测到酶活性。但小地老虎幼虫经以略小于 LD_{50} 剂量 (120μg/头) 灭幼脲处理后，5 龄和 6 龄幼虫体壁在原有的酶浓度下，都表现出酶的活性。5 龄幼虫较对照处理提高了 5 倍，6 龄的提高约 10 倍 (见表 4)。但粘虫幼虫无论 5 龄或 6 龄，灭幼脲处理或未处理，在相同的酶浓度下，始终未测出酶活性。

2. 芳基酰胺酶的活力测定 两种试虫体壁内含有的芳基酰胺酶水平并无差异，但经略低于 LD_{50} 剂量的灭幼脲点滴处理后，小地老虎幼虫体壁的酶活力，提高 1.31 倍(刚蜕皮的六龄幼虫) 及 2.68 倍 (1 日龄的六龄幼虫)，但粘虫幼虫体壁的酶活力却分别下降 60%(刚蜕皮的)及 29% (1 日龄的六龄幼虫)。 灭幼脲分子结构中含有芳基酰胺键，在家蝇和二点叶螨中都证实灭幼脲在活体内可代谢产生 2,6-二氟苯酰胺 (Pimprikar, 1979; Franklin, 1981)，因此，小地老虎幼虫体内因灭幼脲处理而提高芳基酰胺酶的活力，很可

表 4　灭幼脲对两种试虫体壁 MFO 活力的影响*

处理	小地老虎				粘虫
	五龄幼虫	比值**	六龄幼虫	比值**	五龄及六龄幼虫
灭幼脲（四氢呋喃为溶剂）	2.42×10^{-5}M	5.1（四氢呋喃）	6.32×10^{-5}M	9.98（四氢呋喃）12.24（空白）	未测到
对照（四氢呋喃）	4.77×10^{-6}M	—	6.33×10^{-6}M	1.23（空白）	未测到
空白对照	未测到	—	5.16×10^{-6}M	—	未测到

* 表中数值相当于 1 头幼虫体壁的酶浓度 30 分钟内水解基质的生成产物的克分子浓度

** 比值 $=\frac{\text{灭幼脲}}{\text{四氢呋喃}}$ 或 $\frac{\text{灭幼脲}}{\text{空白对照}}$ 及 $\frac{\text{四氢呋喃}}{\text{空白对照}}$

能又是一种因药剂而激活又催化降解自身的一种适应酶，由此又成为小地老虎幼虫表现较高耐药力的一个生化机制。至于粘虫的酰胺酶被抑制的原因，可能由于渗透量较高，在相对高浓度的灭幼脲作用的结果所造成(刚蜕皮幼虫体壁易被穿透，所以酶活性被抑制率也大)，而灭幼脲难于穿透过小地老虎幼虫的体壁，渗入量少，低浓度下对酶易被产生诱导作用，因此，六龄小地老虎刚蜕皮幼虫较 1 日龄的酶活性增加小一半的现象，亦可能也是这个缘故。

讨　　论

一、小地老虎幼虫与粘虫幼虫相比对灭幼脲有较高的自然耐药力，五龄和六龄幼虫的急性触杀 LD_{50} 值，分别较同龄期粘虫高 4.8 和 3.9 倍，也就是说它的自然耐药力较粘虫高 4—5 倍左右. 这种差别，有其形态结构的原因。通过电镜观察，得知小地老虎幼虫的表皮层较同龄期粘虫厚 4.2 倍，几丁层内所含的几丁片层数，又是粘虫的 5 倍，而每一微米长度内的孔道数，仅是粘虫的 1/4 左右；上表皮较粘虫的厚约 2 倍，且仅由少量超微直径的蜡道与体表沟通，而粘虫的上表皮似为匀质结构，未见有蜡道，似易被灭幼脲全面通透，表现在触杀 LD_{50} 与注射 LD_{50} 的比值较同龄期小地老虎幼虫的小3.2 倍，而注射 LD_{50} 值又与小地老虎幼虫比较接近(仅小 1.5 倍)；皮细胞层和底膜的厚度分别较粘虫厚 1.7 和 2.4 倍(见表 3)。由上述超微结构的特点和差别，可以肯定小地老虎幼虫体壁对药物的通透性必然小于粘虫，因而对灭幼脲也起着较高的抗穿透的屏障作用，产生的毒效就小得多。由此可见，通过体壁超微结构的研究，对理解杀虫剂的毒理和更好地发挥药效；有重要参考价值，它是昆虫表现接触耐药力或抗药性的一个普遍的生理结构基础。至于幼虫体壁的化学组成，组分的性质和在表皮层中相互交联及立体结构与抗药性的关系，尚有待进一步研究。

二、体壁皮细胞层含有的水解酶系和氧化酶系的种类及其活力，是对药物产生耐药力的一个生化屏障。试验结果表明，一定剂量的灭幼脲对小地老虎幼虫的多功能氧化酶(此处以 0-脱甲基氧化酶为代表)及芳基酰胺酶都有提高酶活力的效应. 这两种酶都能降解灭幼脲，对灭幼脲发挥毒效有重要影响，当用略小于 LD_{50} 剂量的灭幼脲作点滴处理后，

可使五龄小地老虎幼虫体壁的 MFO 活力增高 5 倍,六龄幼虫增高 10 倍,也可使六龄幼虫的芳基酰胺酶活力增高 1.3—2.7 倍。这种现象可能因灭幼脲诱发了酶活性,或是抑制了 MFO 内源性抑制物,从而使酶得以释出,这种由药剂激活而又降解自身的适应酶,进一步加强了小地老虎体壁对药物的防卫能力。与此对比,敏感性的粘虫幼虫(五龄或六龄)恰好相反,在所用测试条件下,无论空白对照或用略小于 LD_{50} 剂量灭幼脲处理,都未测出酶活性。有可能粘虫幼虫体壁不含有这种酶,或通透进幼虫体壁的灭幼脲剂量不能对 MFO 起有利的作用。但六龄幼虫体壁的芳基酰胺酶则可被上述剂量所抑制,活力降低 29—60%。这些生化分析结果,也充分证明了粘虫幼虫对灭幼脲表现耐药力低的生理生化基础。除所测的两种酶系外,其它有关的生化机制,有待于进一步研究。

至于灭幼脲和胡椒基丁醚(Pb)的混配试验中未见增效,而经灭幼脲单独处理的小地老虎的 MFO 活性,又可被激活或增高的原因,可能有以下几点:(1) Pb 的混合比例不恰当;(2) 体壁中的 MFO 可能原被内源性抑制物所遏制, Pb 对此内源性遏制物不起作用,而灭幼脲能抑制此内源性抑制物或能直接激活 MFO,混配后,由灭幼脲激活的 MFO 正好为 Pb 所抑制,二者作用相互抵销;(3) 灭幼脲的降解途径有多种,即使由 Pb 抑制了 MFO 酶系的氧化代谢途径,它仍可通过芳基酰胺酶等的裂解途径而降解,使无法表现出增效能力。

三、灭幼脲对两种试虫体壁皮细胞几丁合成过程的抑制,使两种幼虫在 LD_{50} 剂量以上,都能使中毒幼虫停止几丁片层的增长。据 Neville (1967) 报道,几丁是逐日增长的,并有日层与夜层之分。几丁分子键与表皮蛋白质分子键的交链及鞣化,才能形成幼虫表皮骨架和肌腱,用以保护虫体和着生肌纤维,所以,扰乱了几丁的生物合成,定会破坏正常的体壁结构和虫体生理。本试验结果也指出:灭幼脲对几丁合成的抑制,有一个剂量的限阈,在限阈以下,低剂量灭幼脲不仅不抑制生长,而且表现生长促进作用,剂量达到限阈,即使一时外观无症状,因几丁合成受阻致变态期间不能忍受体内压力而表皮破裂死亡。因此,正确掌握灭幼脲的使用剂量,对害虫防治和抗性选育都有实际意义。

总之,研究各种主要害虫的体壁超微结构及生理生化基础的差异,以及引起抗药性的机理,是合理使用现有农药和探索新型杀虫剂及制订"有害生物综合治理"(IPM) 规划所不可缺少的理论基础。

酶系活性的激发或抑制的研究,对发展解毒酶系的抑制剂及负交互抗性的药剂有重要作用;也可能成为现有农药药效的一个有效措施。灭幼脲虽属新型杀虫剂,对有些害虫幼期有高效和高选择性,这是它的优点,但作用较慢,低剂量下可能有促生作用,一旦形成抗性,将会引起广泛的交互抗性的可能,是它的重要缺点。所以,在大面积应用灭幼脲以前,应慎重选择敏感的防治对象,按照 IPM 原则,合理使用及搭配药剂品种,充分发挥它的优点,延长使用寿命。

参 考 文 献

张宗炳 1980 昆虫毒理学新进展。pp. 32—72. 北京大学出版社。

Cohen, E. et al. 1982 Insect chitin synthetase as a biochemical probe for insecticidal compound. *IUPAC Pesticide Chemistry*. 3: 25—32.

El-Guindy, M. A. et al. 1983 Laboratory evaluation of the insect growth regulator Dimilin against sus-

ceptible and resistant strains of *Spodoptera littoralis* Boisd. *Intern. Pest control.* 5: 48—51.
———— 1983 The pattern of cross-resistance to insecticides and juvenile hormone analogues in a Diflubenzuron resistance strain of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisd. *Pestic. Sci.* 14(3): 235—45.
Franklin, E. J. 1981 Metabolism of diflubenzuron by spider mites and bean Plants. *Pestic. Sci.* 12: 133—41.
Glesson, P. et al. 1976 Aryl acylamidase activity in larvae of the webbing clothes moth *Tineola bisselliella. Comp. Biochem. and Physiol.* 53B: 187—90.
Hansen, L. G. et al. 1971 Biochemical characteristics of insect microsomes: N- and O-demethylation. *Biochem. pharmacol.* 20: 1569—71.
Marks, E. P. et al. 1982 Isecticide Mode of Action. pp. 281—300. Acad. Press.
Misato, T. et al. 1978 Chitin as a target for pesticide action: Progress and prospect. In *Advance in Pesticide Science* Part III: 458—63.
Neville, A. C. 1967 Chitin orientation in cuticle and its control. in *Advance in insect physiology* 4: 213—80.
Pimprikar, G. D. 1979 Mechanisms of resistance to Diflubenzuron in the house fly *Musca domestica. Pestic. Biochem. and Physiol.* 12: 10—22.
Retuakaran A. et al. 1980 Possible physiological mechanisms for the differential susceptibility of two forest Lepidoptera to diflubenzuron. *J. insect physiol.* 26: 385—90.
Verloop, P. 1977 Pesticide chemistry in 20th Centtury. pp. 237—40. ASC Symposium Series.

ULTRASTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF INTEGUMENTS IN RELATION TO NATURAL TOLERANCE TO DIFLUBENZURIN IN BLACK CUTWORM AND ARMYWORM

GONG GUO-JE　WANG YIN-CHANG　YOU ZI-PING
(Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University)

Diflubenzuron (Dimilin, TH-6040) is one of the effective growth regulators used as the insecticide for controlling the early instar larvae of armyworm *Mythimna separata* (Walker); but the black cutworm *Agrotis ypsilon* Rottem. exhibits considerably higher natural tolerance to this toxicant. The results of comparative toxicity tests in the laboratory and ultrastructural and biochemicol studies of the integuments of both species are summarized as follows:

1. The toxicity tests showed that the LD_{50} for topical application of diflubenzuron to the cutworm larvae in the fifth and sixth instars were 69.59 and 136.23 μg per larva respectively. They were approximately 4.9 and 3.9 times greater than those for the armyworm larvae in the same instars. The median effective doses or ED_{50} for the cutworm larvae in the fifth and sixth instars were 24.67 and 103.21 μg per larve respectively, which were 3.3 and 2.9 times higher than the ED_{100} for the armyworm larvae in the same developmental stages. The action of intoxication was comparatively slow in cutworm larvae and death occurrs chiefly in the prepupal and pupal stages.

2. The causes for higher natural tolerance to diflubenzuron of the black cutworm as revealed by ultrastructural investigation and biochemical studies can be outlined as follows:

a. The larva in the sixth instar has a very thick cuticular layer measuring 32.45 μm which is four times thicker than that of the armyworm in the same instar and there-

are much less pore canals within the endocuticle as compared with that of the latter. Instead, the number of chitinous lamellae within the endocuticle is five times larger than that of the armyworm. These features in cuticular structure presumably contribute to building up an effective barrier against the penetration of the hydrophobic diflubenzuron to reach the epidermal cells.

b. The topical application of diflubenzuron at LD_{50} level to the larvae in sixth instar also enhanced the activities of mixed-function oxidase (MFO) and arylamidase to 10 and 2.7 times respectively, while in the armyworm in the same instar there was no MFO activity detected and the arylamidase activity was inhibited and reduced to 26—29%. Since both enzymes have detoxicating effects to diflubenzuron these biochemical differences seem to be important as the physiological basis for the higher natural tolerance in the black cutworm.

c. The process of chitin synthesis was completely inhibited by diflubenzuron in poisoned larvae when applied at the early stage (within eight hours after the fifth molt) of the sixth intar. After the injection of diflubenzuron at LD_{50} level, most of the larvae showed retarded growth and the chitin content of the cuticle remained unchanged at the original level (18—20%), while in the untreated normal larvae it would increase to a maximum of 50% within four days' growth period. The poisoned larvae would die before or during the prepupal or pupal stage, mainly due to the failure of molting. Presumably this is the main toxic effect of diflubenzuron to the different larval stages of some susceptible insect species.

The problems of diflubenzuron resistance in relation to the cross resistance to organophosphorus, carbamate, and pyrethroid insecticides and negative cross resistance to juvenoids are briefly reviewed and discussed in consideration of application of diflubenzuron in the field for controlling insect pests.

Key words *Agrotis ypsilon* Rottem——*Mythimna separata* (Walker)——diflubenzuron——LD_{50}——cuticle——MFO ——arylamidase



A—B　小地老虎六龄 3 日龄幼虫的中胸背板横切面。A 2,400× B 16,000×
C—D　粘虫六龄 3 日龄幼虫的中胸背板横切面。C 4,000× D 16,000×
1.上表皮+外表皮　2.内表皮的几丁片层　3.皮细胞层　4.蜡道　5.新月形切面的孔道